



УДК 577.152.361'3:577.112.5:543.544.8

МЕТОД СЕЛЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ТРИПТОФАН-
И ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ
КОВАЛЕНТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ. АНАЛИЗ ТОПОГРАФИИ
 α -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+ , K^+ -АТФ-азы

*Азизова Г. И., Клименко А. С., Аристархова Е. А.,
Арзамасова Н. М., Алданова Н. А., Модянов Н. Н.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва*

Предложена методика высокоселективного выделения триптофан- и цистеинсодержащих пептидов из гидролизатов белков на основе ковалентной хроматографии. Методика включает предварительное введение тиольной группы в остатки триптофана последовательной обработкой пептидов 2-нитрофенилсульфенилхлоридом и β -меркаптоэтанолом с последующей иммобилизацией их за счет реакции тиолдисульфидного обмена на соответствующих носителях. Описанная техника применена к анализу гидролизата α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы, полученного в условиях ограниченного трипсинолиза мембраносвязанного фермента. Дополнительно к описанным ранее выделены в индивидуальном состоянии 15 триптофан- и цистеинсодержащих триптических пептидов, входящих в состав экспонированных из мембраны участков белка. Полученная структурная информация позволила с большей точностью определить границы трансмембранных сегментов α -субъединицы в предложенной ранее пространственной модели.

В ходе структурно-функционального исследования Na^+ , K^+ -АТФ-азы (КФ 3.6.1.3) из почек свиньи был осуществлен избирательный триптический гидролиз α -субъединицы фермента в составе мембраносвязанного комплекса [1]. Из растворимой части гидролизата выделено в гомогенном состоянии значительное число пептидов, их исследование позволило получить общее представление о структуре экспонированных участков молекулы каталитической субъединицы АТФ-азы и послужило основой для синтеза олигонуклеотидных зондов.

Анализ полной аминокислотной последовательности α -субъединицы, выведенной из нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК [2], показал, что из гидролизата были выделены далеко не все пептиды, содержащие остатки триптофана и цистеина. Для получения более полной информации о структуре внемембранных фрагментов α -субъединицы, необходимой для уточнения ее пространственной организации [2], нами предпринято целенаправленное выделение триптофан- и цистеинсодержащих пептидов из многокомпонентной смеси пептидов, образовавшейся в условиях избирательного трипсинолиза нативного фермента [1].

К решению задачи был привлечен метод ковалентной, или хемоспецифической, хроматографии, основанной на обратимых химических реакциях между полимерным носителем и определенным аминокислотным остатком полипептидной цепи. Исторически первой для этих целей была использована реакция тиол-дисульфидного обмена, в которую легко вступают сульфгидрильные группы остатков цистеина [3, 4]. Впоследствии были предложены модифицирующие реагенты и соответствующие матрицы для обратимой иммобилизации пептидов по остаткам метионина [5] и лизина [6]. Синтезированы специальные полимеры, несущие группировки (RS_nCl), способные селективно связывать остатки триптофана [7], однако практического применения они не нашли.

Нами разработана методика, в которой реакция тиол-дисульфидного обмена используется для обратимого ковалентного связывания пептидов

по остаткам цистеина и триптофана одновременно. Предварительно с помощью известных реакций во второе положение индольного кольца триптофана вводится сульфгидрильная группа.

Схема используемых реакций приведена ниже:

а) модификация остатков триптофана в белке (пептиде) 2-нитрофенилсульфенилхлоридом [8],

б) превращение образующихся 2-тиоэфирных производных в 2-тиол-триптофан [9],

в) ковалентное связывание белка (пептида) по остаткам цистеина и 2-SH-триптофана на носителе с активированными дисульфидными группами,

г) деиммобилизация соединений с матрицы обработкой конъюгата тиоловым агентом (меркаптоэтанолом).

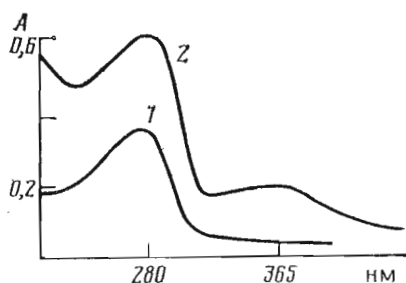
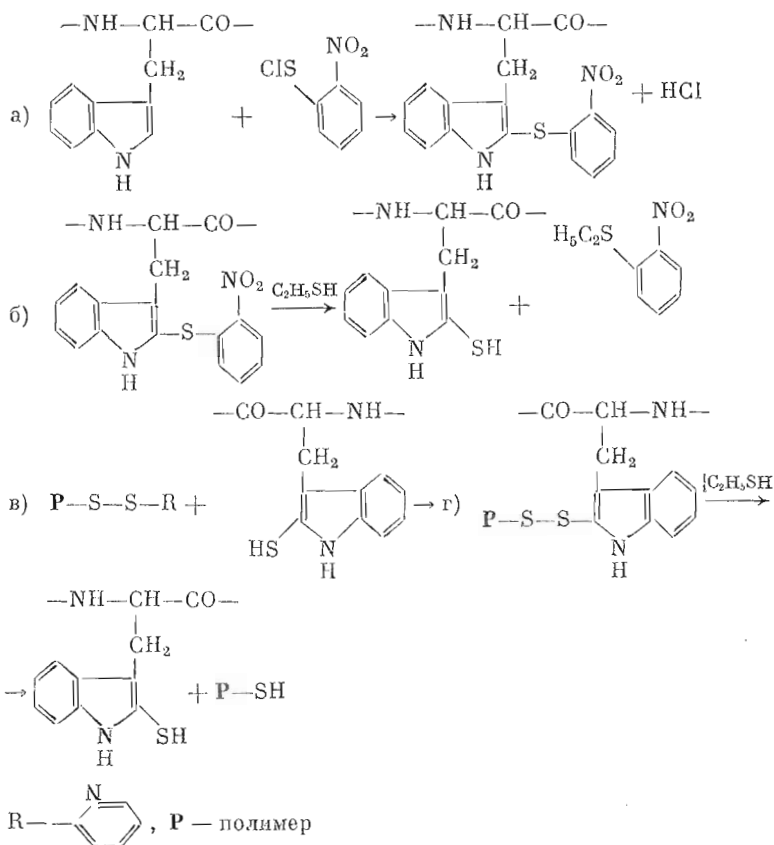


Рис. 1. Спектр поглощения нативного (1) и модифицированного (Nps-Cl) (2) LIV-белка в 50% уксусной кислоте



В качестве объекта исследования для выяснения принципиальной возможности обратимого ковалентного взаимодействия остатков 2-тиолтриптофана в пептидной цепи с соответствующим носителем, содержащим активированные SH-группы, был выбран лейцин, изолейцин, валинсвязывающий белок из *E. coli* (LIV-белок). В состав молекулы белка входят три остатка триптофана и два остатка цистеина [10]. Тиольные группы цистеинов также способны вступать в описанный цикл превращений, однако они могут быть исключены из него предварительным карбоксиметилированием белка. В данном случае этого не делалось и сульфгидрильные группы цистеинов служили, таким образом, «внутренним стандартом» для контроля за ходом всего процесса.

На первой стадии LIV-белок был обработан в кислой среде 20-кратным избытком 2-нитрофенилсульфенилхлорида (Nps-Cl) и после удаления избытка реагента гель-фильтрацией лиофилизирован. Появление в спектре поглощения модифицированного белка пика с λ_{\max} 365 нм (рис. 1) свидетельствует о введении нитрофенилсульфенильных групп в молекулу белка [8].

Стадия тиолиза осуществлялась обработкой белка β -меркаптоэтанолом при pH 8,0 в присутствии 1% додецилсульфата натрия (SDS) в атмосфере азота при комнатной температуре. Контроль за процессом, характеризующимся сдвигом максимума поглощения в более коротковолновую область (365 \rightarrow 330 нм), вели по измерению спектра поглощения продукта реакции. Оптимальные результаты были получены при увеличении продолжительности реакции до 16 ч. Избыток реагента удаляли гель-фильтрацией на биогеле Р-2, уравновешенном 0,1 М натрий-ацетатным буфером, pH 4,0.

Во избежание возможного окисления тиольных групп элюат после обессоливания собирали в реакционный сосуд, где находился носитель — тиол-стекло с предварительно активированными обработкой 2,2'-дипиридилдисульфидом SH-группами.

Иммобилизация белка проводилась при непрерывном легком вращении сосуда в атмосфере азота в течение 20 ч. По данным аминокислотного анализа конъюгата, связывание белка с матрицей было практически полным. Далее белок в иммобилизованном состоянии был подвергнут триптическому гидролизу в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,4. Не связанные с носителем триптические пептиды удаляли отделением сунернатанта и тщательной промывкой стекла как описано в «Экспериментальной части». Идентификацию пептидов, ковалентно связанных с носителем, проводили непосредственным анализом конъюгата. Устойчивость тиол-стекла к действию различных химических реагентов позволяет осуществлять анализ N-концевых аминокислот и аминокислотной последовательности пептидов без их отделения от матрицы [11]. На пяти стадиях деградации по методу Эдмана (в дансильном варианте) смеси пептидов были найдены аминокислоты, отнесение которых к известным последовательностям триптофан- и цистеинсодержащих пептидов LIV-белка [10] не составило труда и было однозначным (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что наряду с остатками цистеина в реакцию тиол-дисульфидного обмена вступили остатки 2-тиолтриптофана, причем выходы по иммобилизации обоих типов сульфгидрильных групп были соизмеримыми (по оценке интенсивности пятен дансильных производных аминокислот на стадиях).

На модельных модифицированных пептидах было показано, что фенилтиогидаントин (РТН) 2-тиолтриптофана имеет хроматографические характеристики, аналогичные характеристикам РТН триптофана при идентификации на пластинках с тонким слоем силикагеля [12], но с реактивом Эрлиха дает желтое, а не фиолетовое окрашивание.

Таблица 1

Аминокислотная последовательность 2-SH-триптофан- и цистеинсодержащих пептидов LIV-белка

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Положение в цепи
1	$\underline{\text{Tyr}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Ala}} \rightarrow \underline{\text{Cys}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Pro}} \rightarrow \underline{\text{Lys}}$	49-56
2	$\underline{\text{Tyr}} \rightarrow \underline{\text{Val}} \rightarrow \underline{\text{Ile}} \rightarrow \underline{\text{Gly}} \rightarrow \underline{\text{His}} \rightarrow \underline{\text{Leu}} \rightarrow \underline{\text{Cys}} \rightarrow \underline{\text{Ser}} \rightarrow \underline{\text{Ser}} \rightarrow \underline{\text{Ser}}$	72-109
3	$\underline{\text{Gln}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Pro}} \rightarrow \underline{\text{Ser}} \rightarrow \underline{\text{Gly}} \rightarrow \underline{\text{Ala}} \rightarrow \underline{\text{Phe}} \rightarrow \underline{\text{Val}} \rightarrow \underline{\text{Trp}} \rightarrow \underline{\text{Thr}}$	270-302
4	$\underline{\text{Ala}} \rightarrow \underline{\text{Asn}} \rightarrow \underline{\text{Ser}} \rightarrow \underline{\text{Val}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Thr}} \rightarrow \underline{\text{Val}} \rightarrow \dots \rightarrow \underline{\text{Trp}} \rightarrow \underline{\text{Asp}}$	306-321
5	$\underline{\text{Gly}} \rightarrow \underline{\text{Phe}} \rightarrow \underline{\text{Glu}} \rightarrow \underline{\text{Phe}} \rightarrow \underline{\text{Gly}} \rightarrow \underline{\text{Val}} \rightarrow \underline{\text{Phe}} \rightarrow \underline{\text{Asp}} \rightarrow \underline{\text{Trp}} \rightarrow \underline{\text{His}}$	326-344

* Стрелками в таблицах указаны стадии деградации по методу Эдмана.

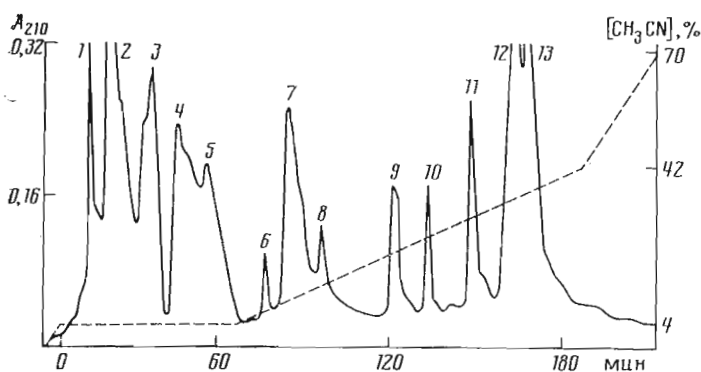


Рис. 2. Разделение триптических пептидов α -субъединицы, содержащих остатки 2-SH-триптофана и цистеина, на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil C₁₈ в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (пунктир). Скорость элюции 1 мл/мин

Описанная техника целенаправленного выделения триптофан- и цистеинсодержащих пептидов была применена к анализу триптического гидролизата Na⁺, K⁺-АТФ-азы, полученного как описано в сообщении [1]. Модификация остатков триптофана достигалась последовательной обработкой смеси триптических пептидов 2-нитрофенилсульфенилхлоридом и меркаптоэтанолом с освобождением от избытка реагентов на каждой стадии гель-фильтрацией в условиях, аналогичных использованным для LIV-белка.

В качестве матрицы была выбрана тиол-сефароза 6В, обладающая высокой удельной емкостью и оптимальными параметрами для ковалентного связывания SH-содержащих пептидов. Иммунизацию проводили в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,0, в течение 20 ч в атмосфере азота при непрерывном перемешивании носителя в растворе пептидов. Затем носитель отделяли от супернатанта на стеклянном фильтре и тщательно промывали, как описано в «Экспериментальной части».

Перевод в раствор связанных с тиол-сефарозой пептидов проводили обработкой конъюгата в реакционном сосуде β -меркаптоэтанолом в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере с последующим обессоливанием супернатанта гель-фильтрацией в том же буфере на колонке с сефадексом G-10.

Для разделения полученной смеси пептидов была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой (Nucleosil C₁₈) в 0,1% трифторуксусной кислоте и градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 70%.

При растворении модифицированного исходного материала в стартовом буфере образовался осадок, который был отделен центрифугированием. В общей сложности при хроматографии было получено 13 фракций (рис. 2). С помощью N-концевого анализа и одной стадии деградации по методу Эдмана было установлено, что каждая из фракций 3, 7 и 9 содержит смесь двух пептидов, а осадок и все остальные фракции элюата являются гомогенными пептидами. Микроколоночной хроматографией на носителе с обращенной фазой в ступенчатом градиенте концентрации ацетонитрила фракции 7 и 9 были разделены на индивидуальные компоненты (рис. 3а–в). При этом была показана возможность дифференцированного обнаружения 2-SH-триптофансодержащих пептидов при 330 нм (рис. 3б).

Результаты определения пяти аминокислотных остатков N-концевой последовательности и аминокислотного состава позволили идентифицировать все полученные триптические пептиды (TS) и локализовать их положение в молекуле α -субъединицы (табл. 2). Пептид TS-0 содержался во фракции, элюирующейся с объемом нанесения.

Следует подчеркнуть, что процесс модификации сложной смеси пептидов протекал высокоселективно, только по остаткам триптофана и цистеина, неспецифической сорбции пептидов на носителе не наблюдалось.

Аминокислотная последовательность 2-SH-триптофан- и цистеинсодержащих триптических пептидов α -субъединицы

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Положение в цепи
TS-7-2	Asp-Gly-Pro-Asn-Ala-Leu-Thr-Pro-Pro-Pro-Thr-Thr-Pro-Glu-Trp-Val-Lys	68-84
TS-0	Phe-Cys-Arg	85-87
TS-5	Ile-Ile-Ser-Ala-Asn-Gly-Cys-Lys	198-205
TS-3	Asn-Cys-Leu-Val-Lys **	348-352
TS-7-1	Asn-Leu-Glu-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Gly-Ser-Thr-Ser-Thr-Ile-Cys-Ser-Asp-Lys	353-370
TS(oc) ***	Met-Thr-Val-Ala-His-Met-Trp-Phe-Asp-Asn-Gln-Ile-His-Glu-Ala-Asp-Thr-Thr-Glu-Asn-Gln-Ser-Gly-Val-Ser-Phe-Asp-Lys	379-406
TS-9-1	Thr-Ser-Ala-Thr-Trp-Leu-Ala-Leu-Ser-Arg	407-416
TS-6	Cys-Ile-Glu-Leu-Cys-Cys-Gly-Ser-Val-Lys	452-461
TS-8	Cys-Ser-Ser-Ile-Leu-Ile-His-Gly-Lys	511-519
TS-12	Val-Leu-Gly-Phe-Cys-His-Leu-Phe-Leu-Pro-Asp-Glu-Gln-Phe-Pro-Glu-Gly-Phe-Gln-Phe-Asp-Thr-Asp-Asp-Val-Asn-Phe-Pro-Leu-Asp-Asn-Leu-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Ile-Ser-Met-Ile-Asp-Pro-Pro-Arg	545-589
TS-2	Ala-Cys-Val-Val-His-Gly-Ser-Asp-Leu-Lys	655-664
TS-4	Leu-Ile-Ile-Val-Gln-Gly-Cys-Gln-Arg	692-700
TS-3	Val-Asp-Trp-Asp-Asp-Arg	881-886
TS-11	Trp-Ile-Asn-Asp-Val-Glu-Asp-Ser-Tyr-Gly-Gln-Gln-Trp-Thr-Tyr-Glu-Gln-Arg	887-904
TS-9-2	Thr-Ala-Phe-Phe-Val-Ser-Ile-Val-Val-Val-Gln-Trp-Ala-Asp-Leu-Val-Ile-Cys-Lys	913-931
TS-10	Met-Tyr-Pro-Leu-Lys-Pro-Thr-Trp-Trp-Phe-Cys-Ala-Phe-Pro-	973-998
TS-13	Tyr-Ser-Leu-Leu-Ile-Phe-Val-Tyr-Asp-Glu-Val-Arg	
TS-1	Arg-Pro-Gly-Gly-Trp-Val-Glu-Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr	1005-1016

*Жирным шрифтом выделены остатки, по которым проходила иммобилизация пептидов.

** Пептиды этой фракции анализировались на смеси двух компонентов.

*** TS(oc) — пептид, выпавший в осадок.

Исходя из имеющихся данных по первичной структуре α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы [2], можно сделать заключение, что из гидрофильной части триптического гидролизата с помощью предлагаемой методики удалось выделить все (7) триптофансодержащие пептиды (в состав двух из них входят также остатки цистеина) и 8 (из 12) цистеинсодержащих пептидов молекулы белка. В сумме эти пептиды содержат 250 аминокислотных остатков, что в совокупности с аминокислотным составом описанных в предыдущем сообщении [1] растворимых триптических пептидов α -субъединицы составляет более половины ее молекулы, включающей 1016 аминокислотных остатков.

Ранее на основании сопоставления результатов расчета профиля гидрофобности полипептидной цепи и структуры гидрофильных триптических пептидов была предложена модель пространственной организации α -субъединицы [2]. Согласно этой модели, каталитическая субъединица Na^+ , K^+ -АТФ-азы 7 раз пересекает липидный бислой. При этом наибольшая часть полипептидной цепи остается экспонированной из мембраны и потенциально доступна действию протеиназ. Это подтверждается получением при ограниченном трипсинолизе нативного фермента значитель-

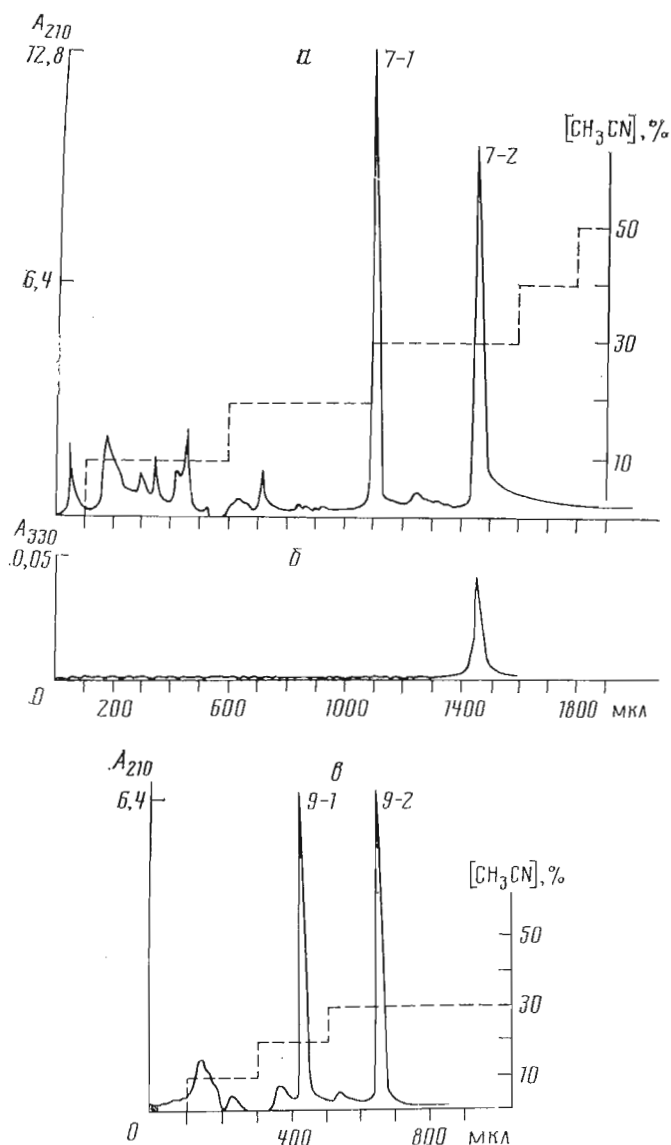


Рис. 3. Рехроматография фракций 7 (а, б) и 9 (в) (см. рис. 2) на колонке (0,2×6,4 см) с носителем Nucleosil C₁₈ в 0,1% трифторуксусной кислоте в ступенчатом градиенте концентрации ацетонитрила (пунктир). Скорость элюции 50 мкл/мин

ного числа пептидов, особенно полно представляющих участки полипептидной цепи 150–280 и 370–770.

В этом отношении топография С-концевой области белка имела чисто предсказательный характер, поскольку фрагментов этой части полипептидной цепи не было выделено. Не исключалась возможность существования дополнительных внутримембранных сегментов, образованных достаточно гидрофобными последовательностями 909–930 и 979–994.

Данные по аминокислотной последовательности пептидов, представленные в табл. 2, дополняют информацию о составе экспонированных областей α-субъединицы и позволяют с большей точностью определить зоны ее трансмембранных сегментов. Так, идентификация пептидов TS-7-2 (68–84), TS-0 (85–87) и TS-3 (348–352) как компонентов гидрофильной области позволили четко локализовать N- и С-концевые границы трансмембранных участков I и IV полипептидной цепи. Несколько пептидов входит в район 350–500 остатков, один из них (TS-7-1), содержащий фосфорилирующийся остаток аспарагиновой кислоты-369, участвует в образовании АТФ-гидролизующего центра.

Наибольший интерес для анализа топографии α -субъединицы представляют выделение и идентификация среди фрагментов внеембранной области пептидов TS-10 (TS-13) (973–998) и TS-9-2 (913–931), подтверждающих справедливость исключения соответствующих участков полипептидной цепи из числа предполагаемых мембранных сегментов.

Помимо обсуждавшихся целей направленное выделение фрагментов полипептидной цепи, содержащих остатки триптофана, может быть использовано при поиске информативных аминокислотных последовательностей, необходимых для синтеза соответствующих олигонуклеотидных зондов, поскольку триптофан (наряду с метионином) кодируется уникальным кодоном. Такие последовательности имеются в найденных пептидах. Применение иммобилизации по остаткам триптофана перспективно в структурных исследованиях труднорастворимых мембранных белков, не содержащих остатков цистеина.

Экспериментальная часть

В работе использовали: трипсин ГРСК (Worthington, США), 2-нитрофенилсульфенилхлорид (Nps-Cl) (Fluka, Швейцария), 2,2'-дипиридилдисульфид (Aldrich, США), трифторуксусную кислоту, пористое тиол-стекло CPG/Thiol с размером зерна 125–177 мкм и диаметром пор 500 Å (Pierce, США), тиол-сефарозу 6B, сефадексы G-10 и G-25 (Pharmacia, Швеция), биогель P-2 (200–400 меш, Bio-Rad, США), β -меркаптоэтанол (Sigma, США), SDS (Serva, ФРГ), ацетонитрил, муравьиную кислоту (Merck, ФРГ), EDTA (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х. ч. или ос. ч. LIV-белок получен по методике, описанной в [13].

Активирование 2,2'-дипиридилдисульфидом и определение емкости пористого тиол-стекла CPG/Thiol осуществляли по методике [14]. Емкость тиол-стекла составила 23 мкмоль SH-групп на 1 г сухого препарата носителя.

Модификация LIV-белка. а) 200 нмоль белка растворяли в 400 мкл 25% уксусной кислоты и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке добавляли 4 мг Nps-Cl (20-кратный мольный избыток на 5 остатков триптофана и цистеина) в 200 мкл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 20°С в темноте. По окончании реакции белок обессоливали на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 50% уксусной кислотой, и лиофилизировали.

б) Лиофилизат растворяли в 500 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, pH 8,0, содержащего 1% SDS, добавляли 20 мкл β -меркаптоэтанол (приблизительно 500-кратный избыток на каждый остаток триптофана) и выдерживали 16 ч при 20°С в атмосфере азота при постоянном перемешивании. Обессоливание проводили гель-фильтрацией на колонке (1,5×45 см) с биогелем P-2, уравновешенным 0,1 М натрий-ацетатным буфером, pH 4,0, содержащим 1% SDS и 3 мМ EDTA. Фракцию, содержащую модифицированный белок, собирали непосредственно в реакционный сосуд с предварительно активированным носителем.

Иммобилизация модифицированного LIV-белка. 200 мг активированного тиол-стекла (20-кратный избыток SH-групп носителя на 5 остатков цистеина и SH-триптофана) с добавленным к нему раствором белка в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,0, содержащем 1% SDS и 3 мМ EDTA, перемешивали 20 ч при 20°С в атмосфере азота в темноте. Затем конъюгат переносили на стеклянный фильтр, тщательно промывали 10-кратным по отношению к набухшему стеклу объемом того же буфера и высушивали на воздухе.

Гидролиз иммобилизованного белка трипсином проводили в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,4, при фермент-субстратном соотношении 1:50 в течение 6 ч при 37°С. Трипсин добавляли двумя порциями с интервалом в 3 ч. По окончании трипсинолиза конъюгат промывали последовательно несколькими объемами исходного буфера, муравьиной кислотой, метанолом и высушивали на воздухе.

Выделение Na^+ , K^+ -АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи и ограниченный триптический гидролиз α -субъединицы проводили как описано в работе [1].

Модификация триптического гидролизата α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. а) Около 120 нмоль лиофилизованного гидролизата белка (получен при трипсинолизе 18 мг фермента) растворяли в 500 мкл 25% уксусной кислоты и добавляли 250 мкл раствора Nps-Cl в ледяной уксусной кислоте (20-кратный избыток в расчете на 30 остатков триптофана и цистеина). Реакционную смесь инкубировали 5 ч при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 20° С в темноте. Гидролизат обессоливали на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 50% уксусной кислотой. Пептиды обнаруживали с помощью Uvicord S II (ЛКВ, Швеция) по поглощению при 280 нм. Элюат лиофилизовали.

б) К лиофилизованной смеси пептидов, растворенной в 1 мл 0,1 М раствора аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,4, добавляли 40 мкл β -меркаптоэтанола и выдерживали 20 ч при 20° С в атмосфере азота при непрерывном перемешивании. Реакционную смесь обессоливали на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 0,1 М натрий-ацетатным буфером, рН 4,0. Суммарную фракцию пептидов собирали в сосуд, содержащий 1 г предварительно замоченной в воде и уравновешенной натрий-ацетатным буфером тиол-сефарозы 6В.

Иммобилизацию модифицированных пептидов α -субъединицы осуществляли при перемешивании в течение 20 ч при 20° С в атмосфере азота в темноте. Затем носитель отфильтровывали и промывали последовательно исходным буфером, водой и 0,1 М раствором аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,4.

Перевод в раствор связанных с носителем пептидов осуществляли обработкой конъюгата 200 мкл β -меркаптоэтанола в 10 мл 0,1 М раствора аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,4, в течение 4 ч при 20° С при постоянном перемешивании в атмосфере азота. Тиол-сефарозу отделяли от супернатанта на стеклянном фильтре и промывали тем же буфером. Супернатант обессоливали на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером, рН 8,4.

Разделение пептидов высокоэффективной жидкостной хроматографией проводили на хроматографе Du Pont Instruments, модель 850 (Du Pont, США) с проточными спектрофотометрами Uvicord II, модель 2151, и Uvicord SI, модель 2158 (ЛКВ, Швеция). Использовали колонку (0,46×25 см) с обращенной фазой Nucleosil C_{18} , диаметр частиц 7 мкм (Macherey-Nagel, ФРГ). Элюировали 0,1% трифторуксусной кислотой в градиенте концентрации ацетонитрила 0–70%. Скорость элюции 1 мл/мин, общее время изменения градиента 3 ч. Пептиды детектировали спектрофотометрически при двух длинах волн: 210 и 330 нм. Рехроматографию пептидов осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром» на колонке (0,2×6,4 см) с носителем Nucleosil C_{18} в 0,1% трифторуксусной кислоте с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила (рис. 3). Скорость элюции 50 мкл/мин.

Деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией дансилльных производных аминокислот проводили на 2–5 нмоль образца по методике [15], фенилтиогидантоины дикарбоновых аминокислот, их амидов и 2-SH-триптофана определяли как описано в сообщении [12].

Определение аминокислотной последовательности пептидов, ковалентно связанных с носителем. К аликвоте тиол-стекла, содержащего смесь пептидов в количестве 5 нмоль, добавляли 200 мкл 50% пиридина, 50 мкл 5% фенилизотиоцианата в пиридине и инкубировали 50 мин при 50° С при периодическом встряхивании. Супернатант отбирали, конъюгат промывали 500 мкл 50% пиридина и дважды по 500 мкл метанола, затем высушивали в вакууме. Добавляли 200 мкл трифторуксусной кислоты и инкубировали 30 мин при 50° С. Трифторуксусную кислоту отделяли, а носитель промывали метанолом и высушивали. $1/_{10}$ тиол-стекла отбирали и определяли N-концевой аминокислотный остаток. Для этого к аликвоте конъюгата добавляли 30 мкл 0,1 М раствора аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,4, и такой же объем дансилхлорида (концентрация 10 мг/мл), инкубировали 45 мин при 45° С. Раствор удаляли, стекло промывали ацетоном, высушивали в вакууме и подвергали кислотному гид-

ролизу по обычной процедуре. После окончания гидролиза солянокислый раствор отделяли от стекла, упаривали и идентифицировали дансильные производные N-концевых аминокислот иммобилизованных пептидов, как указано выше. В случае дикарбоновых аминокислот и их амидов трифторуксусную кислоту упаривали, а остаток нагревали 10 мин при 80° С. Образовавшийся фенилтиогидантоин экстрагировали и идентифицировали [12].

Аминокислотный состав пептидов определяли после кислотного гидролиза (5,7 н. HCl, 105° С, 24 ч) на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Спектры поглощения нативного и модифицированного LIV-белка и гидролизата измеряли на спектрофотометре Hitachi 220A (Hitachi, Япония).

Авторы выражают глубокую признательность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе и ценные замечания при ее обсуждении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамазова И. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И., Назимов И. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1598–1606.
2. Овчинников Ю. А., Арсенин С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Алданова И. А., Арзамазова И. М., Аристархова Е. А., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Гурьев С. О., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1490–1495.
3. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierston M. P. J., Crook E. M. // Biochem. J. 1973. V. 133. № 3. P. 573–584.
4. Egorov T. A., Svenson A., Ryden L., Carlsson J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 8. P. 3029–3033.
5. Shechter Y., Rubinstein M., Patchornik A. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 7. P. 1424–1430.
6. Kiselev A. V., Abdulaev N. G., Vasilov R. G., Nabiev I. R., Ovchinnikov Yu. A. // Proc. III Eur. Conf. of Bioenergetics, Hannover (West Germany). 1984. P. 27–28.
7. Rubinstein M., Shechter Y., Patchornik A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 70. № 4. P. 1257–1263.
8. Scoffone E., Fontana A., Rocchi R. // Biochemistry. 1968. V. 7. № 3. P. 971–979.
9. Wilchek M., Miron T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1972. V. 47. № 5. P. 1015–1020.
10. Овчинников Ю. А., Алданова Н. А., Гринкевич В. А., Арзамазова И. М., Мороз И. Н., Назимов И. В. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 4. С. 564–567.
11. Егоров Ц. А., Шахпаронов М. И., Давидович Ю. А., Лозинский В. И., Заславский В. Ю., Рогожин С. В. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 8. С. 1111–1116.
12. Chen R. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1976. V. 357. № 6. S. 873–886.
13. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гинодман Л. М., Крылова Ю. И. // Биохимия. 1973. Т. 38. Вып. 6. С. 1294–1297.
14. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Богачук А. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 10. С. 962–975.
15. Гринкевич В. А., Арзамазова И. М., Потопенко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. В., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 12. С. 1757–1774.

Поступила в редакцию 5.II.1987

SELECTIVE ISOLATION OF TRYPTOPHAN- AND CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDES BY COVALENT CHROMATOGRAPHY. ANALYSIS OF THE TOPOGRAPHY OF THE Na⁺, K⁺-ATP-ase α -SUBUNIT

AZIZOVA G. I., KLIMENKO A. S., ARISTARKHOVA E. A., ARZAMAZOVA N. M., ALDANOVA N. A., MODYANOV N. N.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A procedure for highly selective isolation of tryptophan- and cysteine-containing peptides from protein hydrolysates has been developed on the basis of covalent chromatography. It includes incorporation of a thiol group into the tryptophan residues by sequential treatment of peptides with 2-nitrophenylsulfenyl chloride and β -mercaptoethanol followed by immobilization on the corresponding supports via thiol-disulfide exchange. The technique is applicable to the analysis of the hydrolysate of the Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit obtained by limited trypsinolysis of the membrane-bound enzyme. Fifteen tryptophan- and cysteine-containing tryptic peptides, which comprise the protein portions exposed outside the membrane, have been isolated in addition to those previously identified. This structural information allows unequivocal determination of boundaries of transmembrane segments of the α -subunit in the spatial model earlier proposed.